

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 779 153

②⑪ N° d'enregistrement national : 99 05861

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : C 12 N 15/12, C 07 H 21/04, C 12 Q 1/68

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 07.05.99.

③⑩ Priorité : 07.05.98 FR 09805809.

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 03.12.99 Bulletin 99/48.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.*

⑥⑩ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA  
RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA — FR et UNI-  
VERSITÉ DE LIMOGES — FR.

⑦② Inventeur(s) : OULMOUDEN AHMAD, GALLET  
PAUL FRANCOIS, ROUZAUD FRANCOIS, MARTIN  
JULIETTE, DELOURME DIDIER, PETIT JEAN  
MICHEL, LEVEZIEL HUBERT, MENISSIER  
FRANCOIS, JULIEN RAYMOND et GROSCLAUDE  
FRANCOIS.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMA-  
CHY SARL.

⑤④ SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR LA MISE EN OEUVRE D'UN PROCEDE D'IDENTIFICATION  
GENETIQUE DE POPULATIONS BOVINES ET DE PRODUITS DERIVES.

⑤⑦ La présente invention a pour objet l'utilisation de sé-  
quences nucléotidiques correspondant aux différentes for-  
mes alléliques du gène Extension du génome bovin, encore  
désigné gène E, ou correspondant à des fragments de ces  
différentes formes alléliques, pour la mise en oeuvre d'un  
procédé d'identification des différentes populations ou ra-  
ces bovines, ou de différents troupeaux bovins regroupant  
chacun plusieurs populations ou races bovines.

FR 2 779 153 - A1



BEST AVAILABLE COPY

## REVENDICATIONS

5 1. Utilisation de séquences nucléotidiques correspondant aux différentes formes alléliques du gène *Extension* du génome bovin, encore désigné gène *E*, ou correspondant à des fragments de ces différentes formes alléliques, pour la mise en oeuvre d'un procédé d'identification des différentes populations ou races bovines, ou de différents troupeaux bovins regroupant chacun plusieurs populations ou races bovines.

10 2. Utilisation de séquences nucléotidiques selon la revendication 1, lesdites séquences nucléotidiques correspondant à l'allèle  $E_I$  représenté sur la figure 1, ou à des fragments de l'allèle  $E_I$ , en combinaison avec les séquences nucléotidiques correspondant aux différentes formes alléliques  $E$ ,  $E^D$  et  $e$ , représentées sur la figure 1, ou à des fragments de ces différentes formes alléliques.

15 3. Utilisation de séquences nucléotidiques selon la revendication 1 ou la revendication 2, pour la mise en oeuvre d'une méthode permettant de contrôler, voire de certifier, l'appartenance d'un animal à une population ou race bovine particulière, ou à un troupeau bovin particulier, ou, au contraire, permettant de certifier l'exclusion de cet animal de cette population ou race, ou de ce troupeau particulier.

20 4. Utilisation de séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les populations ou races bovines ou troupeaux bovins sont d'origine française.

25 5. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond à l'allèle  $E_I$  représenté sur la figure 1, ou aux fragments suivants de l'allèle  $E_I$  :

30 - tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par le nucléotide situé à la position 285 (plus ou moins deux nucléotides), et, d'autre part, par le nucléotide situé à la position 681 de la séquence nucléotidique de l'allèle  $E_I$  représentée sur la figure 1, notamment le fragment de 473 paires de bases de l'allèle  $E_I$  représenté sur la figure 2,

35 - tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par un nucléotide situé entre les positions 1 et 285 (plus ou moins deux nucléotides), et, d'autre part, par le nucléotide situé à la position 307, de la séquence nucléotidique de l'allèle  $E_I$  représentée sur la figure 1, notamment le fragment de 92 paires de bases délimité par les nucléotides situés aux positions 1 et 92 de la séquence nucléotidique de l'allèle  $E_I$  représentée sur la figure 2,

- tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par le nucléotide situé à la position 308 ou 328, et, d'autre part, par le nucléotide situé à la position 681 de la séquence nucléotidique de l'allèle  $E_I$  représentée sur la figure 1, notamment :

5                   . tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par le nucléotide situé à la position 308 ou 328, et, d'autre part, par un nucléotide situé entre la position 691 (plus ou moins deux nucléotides), et la position 966 de la séquence nucléotidique de l'allèle  $E_I$  représentée sur la figure 1,

10                   . le fragment de 381 paires de bases de l'allèle  $E_I$ , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle  $E_I$  représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides situés aux positions 93 et 473.

6. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond aux fragments suivants de l'allèle  $E^D$  :

15                   - le fragment de 461 paires de bases de l'allèle  $E^D$  représenté sur la figure 2,  
                     - le fragment de 59 paires de bases de l'allèle  $E^D$ , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle  $E^D$  représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 59.

20                   7. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond aux fragments suivants de l'allèle  $E$  :

                     - le fragment de 461 paires de bases de l'allèle  $E$  représenté sur la figure 2,  
                     - le fragment de 71 paires de bases de l'allèle  $E$ , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle  $E$  représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides  
25                   situés aux positions 1 et 71,  
                     - le fragment de 369 paires de bases de l'allèle  $E$ , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle  $E$  représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides situés aux positions 93 et 461.

30                   8. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond aux fragments suivants de l'allèle  $e$  :

                     - le fragment de 460 paires de bases de l'allèle  $e$  représenté sur la figure 2,  
                     - le fragment de 91 paires de bases de l'allèle  $e$ , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle  $e$  représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides  
35                   situés aux positions 1 et 91.

9. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence nucléotidique Ia suivante ;

Ia : 5' CCTGGCTGTGTCTGACCTGCTGGTG 3'

5

ou tout fragment d'au moins environ 10 nucléotides contigus de cette séquence Ia, ou toute séquence dérivée de cette séquence Ia, ou d'un fragment susmentionné de cette dernière, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides de ces derniers, lesdits fragments ou séquences dérivées s'hybridant, tout comme la séquence Ia, avec tout ou partie de la séquence nucléotidique complémentaire des séquences nucléotidiques délimitées par les nucléotides situés aux positions 1 et 25, et représentées sur la figure 2, des allèles *E*, *e*, *E<sup>D</sup>*, ou *E<sub>I</sub>*,

10

15

- la séquence nucléotidique IIa suivante ;

IIa : 5' GATGAATGGGGCGCTGCCTCTTCTG 3'

20

ou tout fragment d'au moins environ 10 nucléotides contigus de cette séquence IIa, ou toute séquence dérivée de cette séquence IIa, ou d'un fragment susmentionné de cette dernière, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides de ces derniers, lesdits fragments ou séquences dérivées s'hybridant, tout comme la séquence IIa, avec tout ou partie des séquences nucléotidiques délimitées par les nucléotides situés aux positions 449 et 473 de l'allèle *E<sub>I</sub>*, ou 436 et 461 des allèles *E<sup>D</sup>* et *E*, ou 435 et 460 de l'allèle *e*, et représentées sur la figure 2,

25

30

10. Couples d'amorces, dont chacune des deux amorces comprend, indépendamment l'une de l'autre, environ 10 à environ 30 nucléotides, caractérisés en ce qu'ils sont choisis de telle façon que l'une des deux séquences d'un couple d'amorces s'hybride avec une séquence d'environ 10 à environ 30 nucléotides comprise dans la séquence nucléotidique complémentaire de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et environ 285 des séquences nucléotidiques des allèles *E*, *e*, *E<sup>D</sup>*, ou *E<sub>I</sub>*, représentées sur la figure 1, tandis que l'autre séquence de ce même couple s'hybride avec une séquence d'environ 10 à environ 30 nucléotides comprise entre les nucléotides situés aux positions 670 et 954 des séquences nucléotidiques des allèles *E* ou *E<sup>D</sup>* représentées sur la figure 1, ou comprise entre les

35

nucléotides situés aux positions 669 et 953, ou 682 et 966 des séquences nucléotidiques représentées sur la figure 1 des allèles *e* et *E<sub>I</sub>* respectivement.

11. Couples d'amorces pour l'amplification génique selon la revendication 10, caractérisé en ce que :

- l'une des amorces est choisie parmi les séquences comprenant la séquence Ia, ou tout fragment ou toute séquence dérivée de cette dernière, selon la revendication 9, ladite amorce étant avantageusement marquée, notamment de manière radioactive ou fluorescente,

- tandis que l'autre amorce est choisie parmi les séquences comprenant la séquence IIa, ou tout fragment ou toute séquence dérivée de cette dernière, selon la revendication 9.

12. Procédé d'identification de populations ou races bovines, ou de troupeaux bovins regroupant plusieurs populations ou races bovines, ledit procédé étant effectué à partir d'un échantillon biologique prélevé sur l'animal, notamment à partir de sperme, embryon, sang, lait, poils, carcasse, ou viande, ou autres produits dérivés de ces derniers, et permettant de contrôler, voire de certifier, l'appartenance ou la non-appartenance de l'animal sur lequel a été prélevé ledit échantillon biologique à une population ou race bovine, ou à un troupeau bovin particuliers, ce procédé comprenant :

- une étape d'amplification du nombre de copies des différentes formes alléliques du gène *Extension*, à savoir des allèles *E*, et/ou *e*, et/ou *E<sup>D</sup>*, et/ou *E<sub>I</sub>*, et/ou des fragments de ces formes alléliques, spécifiques d'une population ou race bovine ou d'un troupeau déterminés, et susceptibles d'être présents dans ledit échantillon biologique,

- une étape de détection desdites formes alléliques ou fragments de ces dernières, le cas échéant après digestion enzymatique de ces formes alléliques ou fragments, à l'aide d'enzymes de restriction appropriées,

- le cas échéant, la détection d'un ou plusieurs autres fragments d'ADN spécifiques de populations ou races bovines déterminées, afin de différencier lesdites populations ou races bovines au sein d'un même cheptel, notamment de fragments d'ADN provenant de l'amplification de gènes ou de parties des gènes impliqués dans la coloration des robes des bovidés.

13. Procédé d'identification selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'étape d'amplification du nombre de copies des différentes formes alléliques du gène *E*, ou des fragments de ces formes alléliques, est effectué à l'aide d'un couple

d'amorces selon la revendication 10, permettant l'amplification du nombre de copies de tout allèle  $E$ ,  $e$ ,  $E^D$ , ou  $E_I$ , représentés sur la figure 1, ou du nombre de copies de tout fragment des allèles  $E$ ,  $e$ ,  $E^D$ , ou  $E_I$ , susmentionnés, lesdits fragments comprenant au moins les séquences nucléotidiques délimitées par les nucléotides situés aux positions 285 et 669 sur la figure 1, dans le cas des allèles  $E$  et  $E^D$ , ou au moins la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 285 et 668 sur la figure 1, dans le cas de l'allèle  $e$ , ou au moins la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 285 et 681 sur la figure 1, dans le cas de l'allèle  $E_I$ .

14. Procédé d'identification selon la revendication 13 ou la revendication 14, caractérisé en ce que l'étape d'amplification du nombre de copies des différentes formes alléliques du gène  $E$ , et/ou des fragments de ces formes alléliques, est effectué à l'aide d'un couple d'amorces selon la revendication 11, permettant l'amplification du nombre de copies des fragments de 461 paires de bases des allèles  $E$  et  $E^D$ , ou du fragment de 460 paires de bases de l'allèle  $e$ , ou du fragment de 473 paires de bases de l'allèle  $E_I$ , ces fragments étant représentés sur la figure 2.

15. Procédé d'identification selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que la détection, après l'étape d'amplification, d'une séquence amplifiée contenant au moins la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 285 et 681 de l'allèle  $E_I$  représenté sur la figure 1, telle que la séquence amplifiée, lorsque le couple d'amorces utilisé est le couple Ia/IIa selon la revendication 12, correspondant au fragment de 473 paires de bases de l'allèle  $E_I$  selon la revendication 6, à savoir d'une séquence amplifiée dont la taille est supérieure de 12 ou de 13 paires de bases par rapport à la taille théorique des autres séquences susceptibles d'être amplifiées respectivement à partir des allèles  $E$  et  $E^D$ , ou de l'allèle  $e$ , à l'aide du couple d'amorces utilisé, correspond à la détection de la présence d'une forme allélique  $E_I$  dans l'échantillon étudié.

16. Procédé d'identification selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend, après l'étape d'amplification, et le cas échéant, de détection de l'allèle  $E_I$  :

- une étape de digestion enzymatique à l'aide des enzymes de restriction *AccI* et *BsrFI* des différentes formes alléliques du gène  $E$ , ou des fragments de ces formes alléliques, ayant été amplifiés,

- suivie d'une étape de détection des éventuels différents fragments d'ADN susceptibles d'être obtenus après traitement par lesdites enzymes, à savoir des fragments d'ADN suivants :

5 .. tout fragment d'ADN correspondant à une séquence nucléotidique délimitée d'une part, par un nucléotide situé en l'une des positions 1 à environ 285, et, d'autre part, par le nucléotide situé en position 295 de la séquence nucléotidique de l'allèle  $E^D$  représentée sur la figure 1, notamment, lorsque le couple d'amorces utilisé est choisi parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa selon la revendication 11, le fragment de 59 paires de bases de l'allèle  $E^D$  selon la  
10 revendication 6, et dont la détection est corrélable à la présence d'une forme allélique  $E^D$  dans l'échantillon étudié,

.. tout fragment d'ADN correspondant à une séquence nucléotidique délimitée d'une part, par un nucléotide situé en l'une des positions 1 à environ 285, et, d'autre part, par le nucléotide situé en position 307 de la séquence nucléotidique de l'allèle  $E$  représentée sur la figure 1, notamment, lorsque le couple d'amorces utilisé est choisi  
15 parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa selon la revendication 11, le fragment de 71 paires de bases selon la revendication 7, correspondant à la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 71 de l'allèle  $E$  représentée sur la figure 2, et dont la détection, est corrélable à la présence  
20 d'une forme allélique  $E$  dans l'échantillon étudié,

.. tout fragment d'ADN correspondant à une séquence nucléotidique délimitée d'une part, par un nucléotide situé en l'une des positions 1 à environ 285, et, d'autre part, par le nucléotide situé en position 327 de la séquence nucléotidique de l'allèle  $e$  représentée sur la figure 1, notamment, lorsque le couple d'amorces utilisé est choisi  
25 parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa selon la revendication 11, le fragment de 91 paires de bases selon la revendication 8, correspondant à la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 91 de l'allèle  $e$  représentée sur la figure 2, et dont la détection est corrélable à la présence  
30 d'une forme allélique  $e$  dans l'échantillon étudié.

17. Procédé d'identification selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que :

- la détection d'un génotype comprenant l'allèle  $E^D$  dans l'échantillon biologique étudié, permet de certifier que ledit échantillon provient d'un animal  
35 appartenant à l'une des populations ou races bovines dites "noires", telles que les races Vosgienne, Holstein, ou Salers Noire,

- la détection d'un génotype comprenant l'allèle  $E_I$  dans l'échantillon biologique étudié, permet de certifier que ledit échantillon provient d'un animal appartenant à

l'une des populations ou races bovines suivantes : Aubrac, Gasconne, Parthenaise, ou Maraichine,

5       - la détection d'un génotype comprenant l'allèle  $e$ , mais ne comprenant pas l'allèle  $E_I$  ou  $E^D$  dans l'échantillon biologique étudié, permet de certifier que ledit échantillon provient d'un animal appartenant à l'une des populations ou races bovines dites "rouges", telles que les races Salers, Maine Anjou, Bazadaise, Limousine, Charolaise, Blonde d'Aquitaine, ou Montbéliarde,

10       - la détection du génotypes  $E/E$ , dans l'échantillon biologique étudié, permet de contrôler que les animaux sont supposés appartenir principalement à la population ou race bovine française Normande.

15       18. Kit pour la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un couple d'amorces selon la revendication 10 ou 11.